

ID-Vit[®] Vitamin B₁

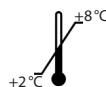
Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von Vitamin B₁ in Vollblut mittels einer Lactobacillus fermentum-beschichteten Mikrotiterplatte Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken

Microbiological test kit for the determination of vitamin B₁ in whole blood using a Lactobacillus fermentum coated microtitre plate For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 2022-07-19

REF KIF001

Σ 96



IVD

CE

REF KIF001.2

Σ 2x 96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
7.1 Wasser	5
7.2 Herstellung der Enzymlösung	5
7.3 Herstellung der Kontrollen	5
7.4 Herstellung der Standardkurve	5
7.5 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	6
7.6 Mikrotiterplatte [PLATE]	6
8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	7
8.1 Probenvorbehandlung	7
8.2 Probenverdünnung	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
9.1 Testvorbereitungen	7
9.2 Testansatz	7
9.3 Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	8
10.1 Berechnung	8
10.2 Qualitätskontrolle	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	10
12.2 Vergleichbarkeit der Werte	10
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
14. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der ID-Vit® Vitamin B₁-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes von Vitamin B₁ in Vollblut. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen inklusive der Standards durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Die bioaktive Komponente des Vitamins B₁ ist Thiaminpyrophosphat. Sie wirkt als Cofaktor an Enzymen, die eine wichtige Rolle im Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel spielen.

Als Coenzym spielt Vitamin B₁ im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel eine wichtige Rolle (Erhaltung des Nervengewebes und des Herzmuskels, Vermittlung der Nervenleitung, Umwandlung von Kohlenhydraten in Fett im Gehirn und in den Muskeln).

Vitamin-B₁-Mangel

Ein schwerer Vitamin-B₁-Mangel, verbunden mit eiweißarmer Ernährung führt zur Beriberi-Krankheit. Schwerwiegender in der Zivilisationsgesellschaft dürfte der Vitamin-B₁-Mangel bei künstlicher Ernährung sein, der zu folgenschwerer Schädigung der Gehirnfunktion führen kann. Weitere Thiamin-Mangelerkrankungen sind die Wernicke-Enzephalopathie, das Korsakow-Syndrom und einige Formen der Landry-schen Paralyse. Als Folgeerkrankung eines Vitamin-B₁- Mangels wurden auch Myopathien beobachtet.

Indikationen für eine Vitamin-B₁-Bestimmung

- Ermittlung des stoffwechselaktiven Vitamin B₁
- Kontrolle der Vitamin-B₁-Versorgung bei künstlicher Ernährung (Ernährung durch AKE-Lösung)
- Störungen des Aminosäurestoffwechsels
- Malabsorption in Verbindung mit Alkoholismus
- Verdacht auf Neuritis

3. TESTPRINZIP

Das Vollblut wird mit einem Puffergemisch vorbehandelt und verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus fermentum* beschichtet sind. Nach Zugabe von Vitamin B₁ als Standard oder als in einer Blutprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim so lange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **37°C** für **48 h**. Das Wachstum des *Lactobacillus fermentum* wird als Trübung bei 610–630 nm (alternativ bei 540–550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge des Vitamins B₁ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF001	KIF001.2
KIF001	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus fermentum</i>	1 x	2 x
	SOL	Probenvorbereitungspuffer	9 x 5 ml	17 x 5 ml
	ENZ	Enzym, lyophilisiert.	9 x	17 x
	DIL	Wasser	4 x 30 ml	4 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin-B ₁ -Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Vitamin-B ₁ -Standard, lyophilisiert	4 x	3 x
	FOL	Abklebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin-B ₁ -Kontrolle 1, lyophilisiert.	4 x	3 x
	CTRL2	Vitamin-B ₁ -Kontrolle 2, lyophilisiert.	4 x	3 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad (90 °C–100 °C)
- Wasserbad (37 °C) oder Thermoblock mit variabler Temperatur (37 °C, 95 °C)
- ELISA-Reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 20–1 000 µl
- 5-ml- bzw. 10-ml-Pipette
- 1,5–2 ml-Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, steril (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test, daher sollten alle Maßnahmen, soweit möglich, für ein steriles Arbeiten getroffen werden (bevorzugt unter Sterilbank bzw. PCR-Hood arbeiten, sterile Arbeitsgeräte verwenden).
- Die GLP (Good Laboratory Practice)-Regeln sind bei der Testdurchführung einzuhalten.
- Die Wasserqualität ist von großer Bedeutung für den Testablauf. Nur das im Testkit enthaltene Wasser [DIL] verwenden.
- Bei den Sterilfiltern muss es sich um Polyethersulfon-Sterilfilter handeln.
- Bei jeder Testdurchführung muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Die Kontrollen sollten bei jedem Ansatz mitgemessen werden.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Antibiotika vorliegen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien als potenziell infektiös behandeln und entsprechend entsorgen.

7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit und die Reagenzien bei 2–8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7.1 Wasser

- Wasser [DIL] (für Medium [ASYMED], Standard [STD] und Kontrollen [CTRL1, CTRL2])
- Deckel nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

7.2 Herstellung der Enzymlösung

- 4 ml Probenvorbereitungspuffer [SOL] in Fläschchen mit lyophilisiertem Enzym [ENZ] überführen und mittels Vortex-Wirbelmischer homogenisieren.
- Die Enzymlösung kann nicht aufbewahrt werden.

7.3 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] sind mit je 500 µl Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.
- Die Kontrollen werden nach der Rekonstitution wie eine Probe behandelt.
- Die Konzentration der Kontrollen ändert sich von Charge zu Charge und ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

7.4. Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard [STD] mit x ml (x = genaues Volumen bitte dem beiliegenden QS-Datenblatt entnehmen) Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.

- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5–2 ml) wird mit dem Standardkonzentrat und Wasser [DIL] eine Standardkurve nach folgendem Schema hergestellt:

Vitamin B ₁ [µg/l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank:	0	+	0	=	500
Standard 1:	2	+	50	=	500
Standard 2:	4	+	100	=	500
Standard 3:	6	+	150	=	500
Standard 4:	9	+	300	=	670
Standard 5:	12	+	300	=	500

7.5 Herstellung des sterilen Assay-Mediums

- Das sterile Assay-Medium muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenmittelbeutel aus dem Fläschchen mit einer Pinzette abschütteln, herausnehmen und werfen.
- Zum Assay-Medium [ASYMED] 10 ml Wasser [DIL] zugeben, das Fläschchen gut verschließen und schütteln. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Mediumflasche im Wasserbad bei 90–100 °C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche schnell auf unter 30 °C abkühlen (bei 2–8 °C für 10 min).
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein steriles Zentrifugentröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

7.6 Mikrotiterplatte [PLATE]

- Die Mikrotiterplatte [PLATE] ist in der Aluminiumverpackung mit dem Trockenmittelbeutel bei 2–8 °C zu lagern.
- Die Mikrotiterplatte [PLATE] muss vor Feuchtigkeit und Kontamination geschützt sein.
- Es ist darauf zu achten, dass die Aluminiumverpackung nicht beschädigt wird.

- Die Aluminiumverpackung nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen.
- Nur die benötigten Mikrotiterstreifen unmittelbar vor Gebrauch entnehmen, um Kontaminationen zu vermeiden.

8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich Vollblut.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8 °C im Dunkeln 1 Tag. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden.

8.1 Probenvorbehandlung

100 µl Blut/Kontrolle mit 400 µl der vorbereiteten Enzymlösung versetzen (Verhältnis 1:5), mischen und bei 37 °C für 30 min im Dunkeln inkubieren. Anschließend bei 95 °C für 30 min erhitzen, schnell abkühlen (bei 2–8 °C für 10 min) und 10 min zentrifugieren (10000g).

8.2 Probenverdünnung

Vom Überstand der vorbehandelten Probe/Kontrolle 200 µl abnehmen, 200 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und -verdünnung entsprechen insgesamt einer 1:10-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

9.1 Testvorbereitungen

Entnehmen Sie die benötigten Reagenzien und Materialien für den durchzuführenden Test und legen Sie den restlichen Testkit zurück in den Kühlschrank. Bringen Sie die benötigten Reagenzien auf Raumtemperatur.

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in die Kavitäten geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardkurve, vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vorspülen.

- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit der im Kit enthaltenen Klebefolie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit der Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei 37°C für 48 h im Brutschrank inkubieren.

9.3 Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Mikrotiterplatte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Mikrotiterplatte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] vorsichtig nach hinten abziehen. Mit einer Hand dabei die Streifen fest im Rahmen halten (Folie ist stark klebend!).
- Eventuell vorhandene Bläschen an der Oberfläche der Messlösung in den Kavitäten zerstören, z. B. mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einer Nadel
- Trübung im ELISA-Reader bei E 610–630 nm messen (alternativ bei E 540–550 nm)

Hinweise

- Nach 48 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch für max. 48 h im Kühlschranks aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.
- Um Zeitverluste durch Feiertage oder Wochenende zu vermeiden, kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch noch nach bis zu 60 h Inkubation ausgewertet werden.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Wir empfehlen für die Auswertung die 4-Parameter-Funktion. Der Probenverdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Der Blank sollte eine optische Dichte < Standard 1 haben. Er dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt.

10.1 Berechnung

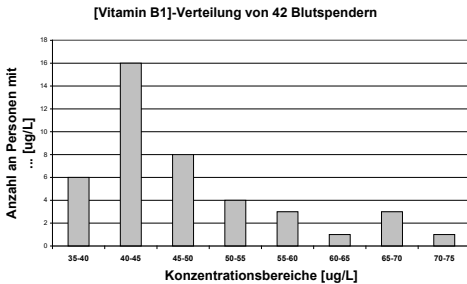
Vitamin B₁ in µg/l = Wert aus Standardkurve × Probenverdünnungsfaktor (10)

Referenzbereich für Vollblut

Anhand einer laborinternen Studie mit Vollblutproben von augenscheinlich Gesunden (n = 42) wurden die folgende Werte ermittelt.

Vitamin B₁: 30–66 µg/l

Verteilungsbereich



Anzahl Proben	42
Mittelwert	48,1
Median	44,3
SD	8,9
MW-2*SD	30,2
MW+2*SD	65,9

Abb. 1: Verteilung der Blutspenderwerte

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 10 ist ein Bereich von 30–150 µg/l Vitamin B₁ abgedeckt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin B₁ dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

10.2 Qualitätskontrolle

Die Extinktion des höchsten Standards muss > 0,6 sein.

Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen oder der höchste Standard außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Serum/Plasma kann nicht im Test eingesetzt werden.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit humanem Vollblut erhoben.

12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 28)

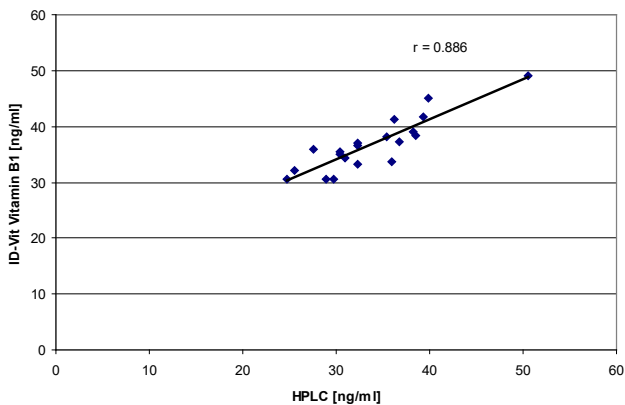
	Mittelwert Vitamin B ₁ [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	54,5	2,75

Inter-Assay (n = 5)

	Mittelwert Vitamin B ₁ [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	56,94	3,81

12.2 Vergleichbarkeit der Werte

Der Vitamin-B₁-Gehalt wurde parallel sowohl mit der HPLC als auch mit dem mikrobiologischen Verfahren in 21 Proben gemessen. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,886$. Die berechnete Regressionsgerade war: $y = 0,7215 x + 12,376$.



1.

10












13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- ID-Vit® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. LITERATUR

2. Koike, H. et al., 2006. Myopathy in thiamine deficiency: analysis of a case. *Journal of the neurological sciences*, **249**(2), pp.175–9.
3. Lonsdale, D., 2006. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, **3**(1), pp.49–59.
4. Dzed, L. et al., 2015. Status of Thiamin deficiency in boarding school children from seven districts in Bhutan with previous history of peripheral neuropathy outbreaks : a cohort study. *Bhutan Health Journal*, **1**(1), pp.49–56.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

ID-Vit[®] vitamin B₁

***Microbiological test kit for the determination of vitamin B₁
in whole blood using a Lactobacillus fermentum coated
microtitre plate***

For use in human and veterinary medicine and in research

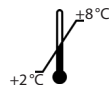
Valid from 2022-07-19

REF **KIF001**

Σ 96

REF **KIF001.2**

Σ 2 x 96



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PRECAUTIONS	17
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
7.1 Water	18
7.2 Preparation of the enzyme solution	18
7.3 Preparation of the controls	18
7.4 Preparation of the standard curve	18
7.5 Preparation of the sterile assay medium	19
7.6 Microtiter plate [PLATE]	20
8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	20
8.1 Sample pretreatment	20
8.2 Sample dilution	20
9. ASSAY PROCEDURE	20
9.1 Test preparations	20
9.2 Test procedure	21
9.3 Measurement	21
10. EVALUATION OF RESULTS	21
10.1 Calculation	22
10.2 Quality control	22
11. LIMITATIONS	23
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
12.1 Precision and reproducibility	23
12.2 Correlation to HPLC	23
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
14. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₁ is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the total vitamin B₁ content in whole blood. The test kit contains the standard and all reagents required to perform the test. It is sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for the evaluation of the results. For use in human and veterinary medicine and in research. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The bioactive form of vitamin B₁ is thiamin pyrophosphate. It plays an important role as a co-enzyme in carbohydrate and amino acid metabolism. Thiamine pyrophosphate is a vital co-factor for enzymes involved in several key metabolic processes in the nervous system, the heart, the blood cells, and the muscle. Vitamin B₁ assists in the conversion of carbohydrates into energy, necessary for healthy brain and nerve cells and heart function.

Vitamin B₁ deficiency

Vitamin B₁ deficiency may result from a deficiency in the diet. Eventually, a severe vitamin B₁ deficiency may lead to beriberi, characterised by nerve, heart, and brain abnormalities. Deficiency may occur in alcoholics or in special clinical situations such as hemodialysis, chronic peritoneal dialysis, or after administration of glucose to a vitamin B₁-depleted patient. Further vitamin B₁ deficiency diseases are Wernicke's encephalopathy, Korsakow syndrome, and some forms of Landry's paralysis. Myopathy also was found in relation to thiamine deficiency.

Indications for vitamin B₁ determination

- Suspicion of vitamin B₁ deficiency
- Determination of the metabolically active vitamin B₁
- Vitamin B₁ supplementation of patients receiving total parenteral nutrition
- Disorders of the amino acid metabolism
- Malabsorption due to alcoholism
- Patients with suspected neuritis

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The whole blood samples are pre-treated and diluted with a buffer mixture, and then transferred into the wells of a microtiter plate coated with *Lactobacillus fermentum*. The addition of vitamin B₁ in either standards or samples gives a vitamin B₁-dependent growth response until vitamin B₁ is consumed. After incubation at **37 °C** for **48 h**, the growth of *Lactobacillus fermentum* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in an ELISA reader and compared to a standard curve generated from the dilution series. The amount of vitamin B₁ is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF001	KIF001.2
KIF001	PLATE	<i>Lactobacillus fermentum</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	SOL	Sample preparation buffer	9 x 5 ml	17 x 5 ml
	ENZ	Enzyme, lyophilised.	9 x	17 x
	DIL	Water	4 x 30 ml	4 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin B ₁ assay medium	4 x	4 x
	STD	Vitamin B ₁ standard, lyophilised.	4 x	3 x
	FOL	Adhesive cover foil	1 x whole 3 x half	3 x whole
	FRA	Replacement holder for microtiter strips	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin B ₁ control 1, lyophilised.	4 x	3 x
	CTRL2	Vitamin B ₁ control 2, lyophilised.	4 x	3 x

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- Water bath (90 °C–100 °C)
- Water bath or thermoblock with variable temperature (37 °C, 95 °C)
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and 20–1 000 µl tips
- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials, sterile
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a sterile disposable syringe
- 15 ml centrifuge tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 g)

6. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work should be observed as far as possible (preferably work in a sterile bench / PCR hood, use of sterile instruments or equipment).
- GLP (Good Laboratory Practice) guidelines have to be observed.
- Water quality is extremely important for the test. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used.
- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- Controls should be measured with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- If a higher dilution results in a higher value measured, inhibitors like antibiotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the label.
- Wear gloves during the test.
- Used microtiter stripes [PLATE] and materials that have been in contact with patient samples should be handled and disposed as potentially infectious.

7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8 °C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each run. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

7.1 Water

- Water [DIL] (for medium [ASYMED], standard [STD] and controls [CTRL1, CTRL2])
- Push the lid up and pull it back to the rim of the glass, then twist the whole cap off.

7.2 Preparation of the enzyme solution

- Add 4ml sample preparation buffer [SOL] to a vial of lyophilised enzyme [ENZ], then homogenise using a vortex.
- Enzyme solution cannot be stored.

7.3 Preparation of the controls

- The lyophilised controls [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended with each 500 µl water [DIL] from the test kit, then homogenise using a vortex.
- After reconstitution, the controls are treated like samples.
- The concentration of the controls changes from lot to lot and is stated in the product specification.

7.4 Preparation of the standard curve

- For the preparation of the standard curve, standard concentrate is needed. To prepare standard concentrate, resuspend the lyophilised standard [STD] with x ml (x = please see the enclosed quality control protocol for the volume needed) water [DIL] supplied with the test kit, then homogenise using a vortex.

- Prepare a standard curve in 6 sterile reaction tubes (1.5–2 ml volume) from standard concentrate and water [DIL] following the scheme depicted in the table below:

Vitamin B ₁ [µg/l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	500	+	0	=	500
Standard 1: 2	450	+	50	=	500
Standard 2: 4	400	+	100	=	500
Standard 3: 6	350	+	150	=	500
Standard 4: 9	370	+	300	=	670
Standard 5: 12	200	+	300	=	500

7.5 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove lyophilised assay medium from the desiccant bag in the assay medium bottle by taking the bag with a forceps and shaking it whilst still inside the bottle. Then remove the clean desiccant bag and discard it.
- Add 10 ml water [DIL] to the assay medium bottle [ASYMED], close the bottle firmly and shake it. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Heat the medium bottle in a water bath at 90–100 °C for 5 min, shake well at least 2 times during this incubation time. Take care that the medium bottle is always firmly closed.
- Quickly cool the medium bottle to < 30 °C (at 2–8 °C for 10 min).
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a sterile centrifuge tube (15 ml, e.g. Falcon).
- After this preparation, the sterile assay medium can be used in the test.

7.6 Microtiter plate [PLATE]

- Store the microtiter plate [PLATE] in the aluminium packaging containing the desiccant bag at 2–8 °C.
- The microtiter plate [PLATE] has to be protected from humidity and contamination.
- Take care that the aluminium packaging is not damaged.
- Carefully close the aluminium packaging after opening.
- Take only the microtiter stripes needed directly before usage to avoid contamination

8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

- Use whole blood for analysis.
- Samples are stable at 2–8 °C for one day in the dark. For longer storage, samples should be frozen and kept at -20 °C.

8.1 Sample pretreatment

Add 100 µl whole blood/control to 400 µl of prepared enzyme solution (ratio 1:5), mix, and incubate at 37 °C for 30 min in the dark. Then heat to 95 °C for 30 min, cool quickly (at 2–8 °C for 10 min) and centrifuge for 10 min at 10 000 *g*.

8.2 Sample dilution

Take 200 µl from the supernatant of the prepared serum/control, add 200 µl water [DIL] and mix. The sample treatment and dilution result in a total dilution of 1:10 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from kit. Return unused strips and any unused test kit component to the original packaging, and put in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

9.2 Test procedure

- Take as many microtiter strips as needed from the kit and put them in the second microtiter strip holder [FRA].
- Put 150 µl sterile assay medium into the cavities.
- Add each 150 µl of the prepared standard curve, samples and controls into the respective cavities. Pre-rinse each pipet tip with standard, control or sample solution, respectively.
- Carefully seal the plate with adhesive cover foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing the foil down with the hand!
- Keep at 37 °C for 48 h in an incubator.

9.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil [FOL] firmly down again with the hand.
- Upturn the microtiter plate [PLATE], put it onto a tabletop and shake the microbes well.
- Turn the microtiter plate [PLATE] over again and carefully remove the adhesive cover foil [FOL]. During this, fix the strips in the frame with your hand because the foil is highly adhesive.
- Remove air bubbles in the cavities using a pipet tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA reader at E 610–630 nm (alternatively at E 540–550 nm).

Please note

- After 48 h incubation time, the microtiter plate [PLATE] may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.
- To prevent time-loss through public holidays or weekends, the microtiter plate [PLATE] may also be evaluated after 60 h incubation.

10. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the 4 parameter algorithm to calculate the results. The sample dilution factor has to be considered for data evaluation.

The blank should have an optical density < standard 1. It serves as optical control to exclude contaminations and is not included in the calculation of results.

10.1 Calculation

Vitamin B₁ in µg/l = value from the standard curve × sample dilution factor (10)

Reference value for whole blood

Based on studies of blood samples of apparently healthy persons (n = 42), the following values were estimated.

Vitamin B₁: 30–66 µg/l

Distribution

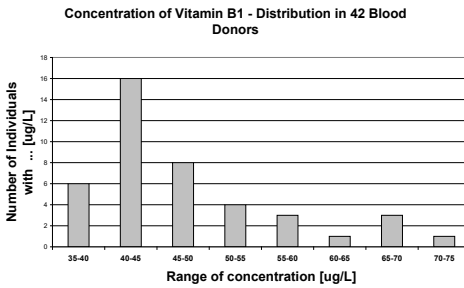


Fig. 1: Distribution of blood donor values

Number of samples	42
Mean	48.1
Median	44.3
SD	8.9
MW-2*SD	30.2
MW+2*SD	65.9

Please note

A concentration range of 30–150 µg/l vitamin B₁ is covered at a sample dilution of 1:10.

We recommend each laboratory to develop its own normal range as normal ranges strongly depend on the choice of the patient collective. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

10.2 Quality control

The extinction of the highest standard has to be > 0.6.

Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample or the highest standard are outside the acceptable limits.

11. LIMITATIONS

Serum/plasma cannot be used in the assay.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been collected using human serum samples.

12.1 Precision and reproducibility

Intraassay (n = 28)

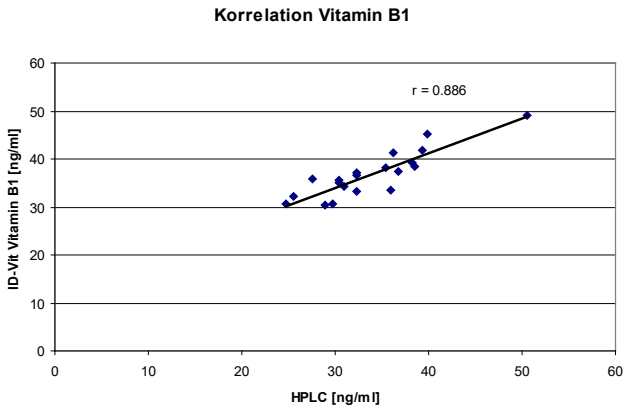
	Vitamin B ₁ [µg/l]	CV [%]
Sample	54.5	2.75

Interassay (n = 5)

	Vitamin B ₁ [µg/l]	CV [%]
Sample	56.94	3.81

12.2 Correlation to HPLC

The concentration of vitamin B₁ was determined by the ID-Vit® Vitamin B₁ assay in parallel to HPLC in 21 samples. Correlation coefficient: $r = 0.886$. Regression line: $y = 0.7215x + 12.376$.



13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- ID-Vit® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Control samples should be analysed with each run.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. REFERENCES

1. Koike, H. et al., 2006. Myopathy in thiamine deficiency: analysis of a case. *Journal of the neurological sciences*, **249**(2), pp.175–9.
2. Lonsdale, D., 2006. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, **3**(1), pp.49–59.
3. Dzed, L. et al., 2015. Status of Thiamin deficiency in boarding school children from seven districts in Bhutan with previous history of peripheral neuropathy outbreaks : a cohort study. *Bhutan Health Journal*, **1**(1), pp.49–56.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by



Attention



Consult instructions for use



Consult specification data sheet

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

